

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 7 日 (07.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/061717 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/63
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019160
- (22) 国際出願日: 2004 年 12 月 15 日 (15.12.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2003-423004
2003 年 12 月 19 日 (19.12.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5418510 大阪府大阪市中央区道修町 2 丁目 2 番 8 号 Osaka (JP). 株式会社高研 (KOKEN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1710031 東京都豊島区目白 3 丁目 1 4 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 水口 佳子 (MINAKUCHI, Yoshiko) [JP/JP]; 〒5670878 大阪府茨木市蔵垣内 1 丁目 3 番 4 5 号 住友製薬株式会社内 Osaka (JP). 落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro) [JP/JP]; 〒1040045 東京都中央区築地 5-1-1 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 五十部 穰 (ISOBE, Yutaka); 〒5540022 大阪府大阪市此花区春日出中 3 丁目 1 番 9 8 号 住友製薬株式会社 知的財産部内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL METHOD OF NUCLEIC ACID TRANSFER

(54) 発明の名称: 新規な核酸導入法

(57) Abstract: It is intended to provide a method of transferring a nucleic acid which comprises: (a) the step of contacting the nucleic acid with a cell in a medium; and (b) the step of, after the completion of the above step (a), contacting a metal salt solution of a high concentration with the medium in the step (a); an agent for transferring a nucleic acid which contains a solid metal salt or a metal salt solution of a high concentration as a component thereof; and so on.

(57) 要約: (a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、および (b) 前記 (a) の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記 (a) の培地と接触させる工程、を含む核酸導入法、ならびに固形金属塩または高濃度の金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤などを提供する。

WO 2005/061717 A1

明細書

新規な核酸導入法

技術分野

- 5 本発明は、新規な核酸導入法に関する。より詳細には、本発明は、高濃度の金属塩溶液を利用した新規な核酸導入法に関する。

背景技術

- 10 ゲノムサイエンスの発展により新しい疾患関連遺伝子が数多く発見され、これらの遺伝子の機能解析が急務となっている。現在汎用されている遺伝子の機能解析手法であるDNAマイクロアレイを用いたトランスクリプトームや酵母two-hybrid法では、直接培養細胞内における機能を解析することは困難である。このため、治療標的分子の同定および治療創薬への直接的な結びつけを可能とするための、細胞もしくは個体レベルでの遺伝子機能の網羅的な解析技術の確立が望まれている。細胞および固体レベルでの解析では、評価対象とする遺伝子の配列をもとに核酸を利用して遺伝子がコードするmRNAを細胞内で過剰発現もしくはノックダウンさせ、その結果生じる細胞の機能変化を解析する手法が利用される。近年、細胞の機能をマルチイメージアナライザーにより様々なパラメーターで解析する方法が確立され、これを用いることにより細胞レベルでの網羅的な遺伝子機能解析も可能となっていること
- 15 から、遺伝子発現を調節する手段の確立は遺伝子の機能解析の重要な課題となっている。

- 25 遺伝子の発現を制御する核酸として、遺伝子過剰発現にはプラスミドDNA (pDNA) やウイルスベクターが、遺伝子のノックダウンにはアンチセンスDNA (AS-DNA) や短い干渉RNA (short interfering RNA; siRNA) などが用いられる。これら核酸と細胞膜は共にアニオン性を示し電氣的に反発してしまうため、核酸を単独で直接細胞内に導入することは困難である。このため、細胞を用いた遺伝子機能解析では、ウイルスベクター法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、リポフェクション法、高分子ミセルベクター法など、これまでに開発された核酸の細胞内導入方法の利用が必要となる。

ウィルスベクター法 (Mah C et al, Virus-based gene delivery systems., *Clin Pharmacokinet.* 2002;41(12):901-911) は、ウィルスベクター自体が細胞への感染能力を保持しているため、目的の遺伝子をウィルスベクターに挿入し細胞に添加するだけで遺伝子が細胞に導入され、高効率で目的とする遺伝子を発現することができる。しかし、この方法では感染により細胞内に核酸が導入されるため、感染に対する防御機構などが細胞に生じる結果、本来目的とする遺伝子の機能の検出にノイズが生じる恐れがある。また、ウィルスベクターに挿入可能な遺伝子の大きさに制限があること、遺伝子の導入およびウィルスの増幅と精製作業が煩雑であることなどから、多種類の遺伝子機能の網羅的な解析には適さない。

pDNA、AS-DNA、siRNAの細胞内への導入に関しては、上記のエレクトロポレーション法 (Gehl J, *Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research.*, *Acta Physiologica Scandinavica* 2003;117(4):437-47)、リン酸カルシウム共沈法 (Batard P et al, *Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection.*, *Gene* 2001;270:61-68)、DEAE-デキストラン法 (Holter W et al, *Efficient gene transfer by sequential treatment of mammalian cells with DEAE-dextran and deoxyribonucleic acid.*, *Exp Cell Res.* 1989;184(2):546-551)、リポフェクション法 (Rocha A et al, *Improvement of DNA transfection with cationic liposomes.*, *Life Physiology Biochemistry* 2002;58(1):45-56)、または高分子ポリマーを用いた方法 (De Smedt SC, et al, *Cationic polymer Based Gene Delivery Systems.*, *Pharmaceutical Research* 2000;17(2):113-26) などの利用が必要となる。

エレクトロポレーション法は細胞を核酸溶液中に懸濁して直流高電圧のパルスをかけることで細胞の膜透過性を亢進させて導入する方法である。この方法は高効率で核酸を導入することができる反面、細胞へのダメージが大きいことを特徴としており、核酸導入後の細胞機能変化の解析を目的とする場合には適さない。

リン酸カルシウム共沈法は細胞の食作用を利用して核酸を導入する方法である。この方法は再現性が乏しく、また導入効率も悪い。そのため安定した遺伝子導入が必要となる遺伝子の機能解析には適さない。

DEAE-デキストラン法、リポフェクション法および高分子ポリマーを用いた方法

は、細胞膜との膜融合を利用して核酸を導入する方法である。これらの方法のなかでは、導入効率や簡便性、汎用性、再現性という点でリポフェクション法が最も優れている。しかしリポフェクション法では細胞毒性が高いことが知られているため、細胞のビアビリティが重要である遺伝子の機能解析には問題が残る。またリポフェクション法では、細胞への導入に先立ってリポソーム試薬と核酸を混合して複合体を形成させる必要があるが、再現性が高いとはいえ複合体調製時の微妙な差によって細胞への導入効率が異なってくることから、多数の核酸を取り扱う場合には個々の操作に細心の注意が必要となり、操作が煩雑となる。

以上から、細胞レベルで多数の遺伝子機能を網羅的に解析するためには、低細胞毒性でより簡便にかつ効率的に細胞内に核酸を導入する方法の開発が望まれている状況にあった。

発明の開示

本発明の目的は、低細胞毒性で簡便かつ高効率で細胞へ核酸を導入することのできる、新規な核酸導入法を提供することにある。

本発明者らは、核酸（単独）と細胞とを培地中で混合し、その後高濃度の塩化カルシウム溶液を培地に添加したところ、驚くべきことに、核酸が効率よく細胞に導入されその機能を発現できることを見出した。この新たな知見から、本発明者らは、塩化カルシウム、さらには金属塩全般について、新規な核酸導入剤として利用できるとの確信を得た。

本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

すなわち本発明は、下記に掲げるものである：

(1) 以下の工程（a）及び（b）を含む核酸導入法：

（a）核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

（b）前記（a）の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記（a）の培地と接触させる工程、

（2）核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイムである、前記（1）記載の核酸導入法、

（3）二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、前

記（２）記載の核酸導入法、

（４） 環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、前記（３）記載の核酸導入法、

（５） オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、
5 ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'－O－（2－メトキシ）エチルー修飾核酸（2'－MOE－修飾核酸）、短い干渉RNA（siRNA）、架橋型核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、前記（２）記載の核酸導入法、

（６） 核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、前記（１）～（５）いずれか記載の核酸導入法、
10

（７） 生体由来物質がアテロコラーゲンである、前記（６）記載の核酸導入法、

（８） 工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M～3.0Mの範囲内である、前記（１）～（７）いずれか記載の核酸導入法、

（９） 工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M～2.0Mの範囲内である、前記（８）記載の核酸導入法、
15

（１０） 工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程（a）の培地500μL当たり1μL～20μLの範囲内である、前記（１）～（９）いずれか記載の核酸導入法、

（１１） 工程（a）の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程（a）の培地500μL当たり2μL～10μLの範囲内である、前記（１０）記載の核酸導入法、
20

（１２） 金属塩溶液が二価金属の塩化物溶液である、前記（１）～（１１）いずれか記載の核酸導入法、

（１３） 二価金属の塩化物溶液が塩化カルシウム溶液である、前記（１２）記載の核酸導入法、
25

（１４） 固形金属塩または高濃度金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤、

（１５） 固形金属塩または高濃度金属塩溶液からなる核酸導入剤、

（１６） 前記（１）～（１３）いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、前記（１４）または（１５）記載の核酸導入剤、

(17) 高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M~6.0Mの範囲内である、前記(14)~(16)いずれか記載の核酸導入剤、

(18) 高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M~4.0Mの範囲内である、前記(17)記載の核酸導入剤、

5 (19) 金属塩が二価金属の塩化物である、前記(14)~(18)いずれか記載の核酸導入剤、

(20) 二価金属の塩化物が塩化カルシウムである、前記(19)記載の核酸導入剤、

10 (21) 前記(14)~(20)いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット、

(22) 前記(14)~(21)いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用、

(23) 以下の工程(a)及び(b)を含む核酸導入法：

(a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

15 (b) 前記(a)の工程の後、高濃度の塩化カルシウム溶液を前記(a)の培地と接触させる工程、

(24) 核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイムである、前記(23)記載の核酸導入法、

20 (25) 二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、前記(24)記載の核酸導入法、

(26) 環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、前記(25)記載の核酸導入法、

25 (27) オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチルー修飾核酸(2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA(s i RNA)、架橋型核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、前記(24)記載の核酸導入法、

(28) 核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、前記(23)~(27)いずれか記載の核酸導入法、

(29) 生体由来物質がアテロコラーゲンである、前記(28)記載の核酸導入法、

(30) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.1M~3.0Mの範囲内である、前記(23)~(29)いずれか記載の核酸導入法、

(31) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.5M~2.0Mの範囲内である、前記(30)記載の核酸導入法、

(32) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の量が、工程(a)の培地500 μ L当たり1 μ L~20 μ Lの範囲内である、前記(23)~

(31)いずれか記載の核酸導入法、

(33) 工程(a)の培地と接触させる高濃度塩化カルシウム溶液の量が、工程(a)の培地500 μ L当たり2 μ L~10 μ Lの範囲内である、前記(32)記載の核酸導入法、

(34) 固形塩化カルシウムまたは高濃度塩化カルシウム溶液を成分として含有する核酸導入剤、

(35) 固形塩化カルシウムまたは高濃度塩化カルシウム溶液からなる核酸導入剤、

(36) 前記(23)~(33)いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、前記(34)または(35)記載の核酸導入剤、

(37) 高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.1M~6.0Mの範囲内である、前記(34)~(36)いずれか記載の核酸導入剤、

(38) 高濃度塩化カルシウム溶液の濃度が0.5M~4.0Mの範囲内である、前記(37)記載の核酸導入剤、

(39) 前記(34)~(38)いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット、ならびに

(40) 前記(34)~(39)いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用。

図面の簡単な説明

図1は、本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドを293細胞へ導入した結果を示すグラフである。

図2は、予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で293細胞を懸濁して播種した場合のGFPの発現効率を示すグラフである。

5 図3は、本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドをHeLa細胞へ導入した結果を示すグラフである。

図4は、本発明の核酸導入法を用いることにより、siRNAをNEC8細胞へ導入した結果を示すグラフである。

10 図5は、本発明の核酸導入法を用いることにより、GFP発現プラスミドとアテロコラーゲンとの複合体を293細胞およびHeLa細胞へ導入した結果を示すグラフである。

図6は、本発明の核酸導入法を用いることにより、siRNAとアテロコラーゲンとの複合体をPC-3M-Luc-C6細胞へ導入した結果を示すグラフである。A)はヒトenhancer of zeste homolog2 (EZH2)に対するsiRNA導入の結果を、B)はphosphoinositide 3'-hydroxykinase p110-alpha subunit (p110-alpha)に対するsiRNA導入の結果を、それぞれ示す。

15

発明を実施するための最良の形態

本発明は、少なくとも以下の工程(a)及び(b)：

20 (a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

(b) 前記(a)の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記(a)の培地と接触させる工程、

を含む核酸導入法を提供する。

25 本発明の核酸導入法において導入に用いられる核酸は、方法の原理上、その種類に制限は無くどのような核酸であっても導入対象として用いることができる。すなわちポリヌクレオチド(DNA、RNA)、オリゴヌクレオチド、またはリボザイム等のいずれの核酸であっても良く、また一本鎖・二本鎖およびこれらの類縁体のいずれの形態であっても良い。すなわち本発明の核酸として具体的には、一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリ

ボザイム等が挙げられる。

本発明の核酸が二本鎖DNAまたは二本鎖RNAである場合、直鎖状または環状のいずれの形態であっても良い。さらに本発明の核酸が環状二本鎖DNAの場合、プラスミドの形態とすることができる。当該プラスミドは、発現プラスミドまたは
5 非発現プラスミドのいずれの形態であっても良い。

本発明の核酸が一本鎖DNAまたは一本鎖RNAである場合、センス鎖またはアンチセンス鎖のいずれも用いることができる。

本発明の核酸がオリゴヌクレオチドである場合、導入するオリゴヌクレオチドの種類に制限はなく、一本鎖オリゴヌクレオチド、二本鎖オリゴヌクレオチドまたは
10 これらの類縁体のいずれも用いることができる。具体的には、デオキシリボヌクレオチド (DNA)、リボヌクレオチド (RNA)、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ) エチル-修飾核酸 (2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA (small interfering RNA: siRNA)、架橋型核酸 (Locked Nucleic Acid: LNA; Singh, et al, Chem. Commun., 455, 1998)、ペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acid: PNA; Nielsen, et al., Science, 254, 1497, 1991)、またはモルフォリノ・アンチセンス核酸 (Morpholino antisense; Summerton and Weller, Antisense & Nucl
15 eic Acid Drug Development, 7, 187, 1997)などを例示することができる。

前記核酸は、通常の遺伝子導入に用いられる濃度 (0.001~1000 μ g/mL) で使用することができる。

前記核酸は、細胞培養に支障のない溶媒に溶解して導入に用いることができる。当該溶媒としては、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液 (シグマ社)、TRIS緩衝液 (シグマ社)、PBS緩衝液 (Invitrogen社)、細胞培養培地等を挙げることができる。

前記核酸は、細胞毒性のない生体内分解性の物質や生体由来物質と複合体を形成した形態、あるいはこれらの物質に封入された形態であっても良い。ここで生体内分解性の物質としては、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸およびこれらの共重合体やラクトン系ポリマー、ポリエチレングリコール系ポリマー等を挙げることができる。また生体由来物質としては、例えばキトサン、ゼラチン、コラーゲン、酵素可溶化コラーゲン (アテロコラーゲン)、またはこれらの修飾物等を挙げることが
25

できる。核酸とこれら生体内分解性の物質や生体由来物質との複合体あるいは封入体の作製は、例えば文献、Panyman et al, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue., Adv Drug Deliv Rev. 2003;55(3):329-47, Li XW et al, Sustained expression in mammalian cells with DNA complexed with chitosan nanoparticles., Biochem Biophys Acta. 2003;1630(1):7-18、WO 03/000297号公報などに従い行うことができる。

前記で生体由来物質としてはコラーゲンあるいは酵素可溶化コラーゲン（アテロコラーゲン）が好ましく、その種類、由来、型等に特に制限はない。種類としては未修飾物あるいはその修飾物を挙げることができる。修飾物としては、側鎖アミノ基、カルボキシル基の化学修飾、あるいは化学的・物理的架橋物を用いることができる。

当該コラーゲン溶液の濃度は0.00001%～3% (0.0001mg/mL～30mg/mL) の範囲で使うことができ、好ましくは0.0001%～0.3%、より好ましくは0.0005%～0.1%の範囲で使うことができる。

前記生体内分解性の物質や生体由来物質と複合体あるいは封入体を形成することにより核酸は安定化されかつ徐放化されることから、当該複合体あるいは封入体を細胞内に導入することにより、核酸の効果の持続を図ることができる。

本発明の核酸導入法において用いられる細胞は、方法の原理上、適応細胞種に制限はない。具体的には、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、神経芽細胞、リンパ芽球、浮遊細胞、星状膠細胞、円形細胞、紡錘細胞、アメーバ様細胞などに対して本発明の核酸導入法を適用することができる。

本発明の核酸導入法において用いられる培地は、細胞が死滅せず、かつ本発明の核酸導入法による細胞内への核酸の取り込みに支障をきたさないような培地であれば、如何なる培地であっても良い。具体的には、通常の細胞培養に用いられる培養用培地、緩衝液、または血清をさらに含有する培養用培地や緩衝液が挙げられる。

ここで培養用培地としては、各々の細胞に合った培養用培地であればどのような培地であっても良い。例えばRPMI1640 (Invitrogen社)、DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIA (Invitrogen社)、F-10 Nutrient Mixture (Invitrogen社)、F-12 Nutrient Mixture (Invitrogen社)、Iscove's Modified Dulbecco's Media (Invitro

10

gen社) またはMINIMUM ESSENTIAL MEDIA (Invitrogen社) などが例示される。

また緩衝液としては、HEPES緩衝液(シグマ社)、TRIS緩衝液(シグマ社)、PBS緩衝液(Invitrogen社) などが例示される。

5 また血清としては、ウシ胎児血清、ウシ血清、仔ウシ血清、ウマ血清などが例示される。培地中の血清の濃度は、細胞培養に適した濃度であればどのような濃度であっても良い。好ましくは0~20%(v/v)の範囲が挙げられ、より好ましくは5~10%(v/v)の範囲が挙げられる。

10 本発明の核酸導入法において用いられる「金属塩溶液」は、細胞培養に影響しない範囲内であれば、如何なる金属塩溶液を用いても良い。細胞培養に影響するか否かは、細胞培養液に金属塩溶液を添加した場合としない場合とで細胞増殖速度(細胞密度)等を比較することにより、容易に調べることができる。

15 ここで金属塩とは、具体的には、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、鉄、銅、または亜鉛等の金属の塩が挙げられる。当該金属の塩として、より具体的には、例えば前記金属の塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、炭酸塩、または硝酸塩等が挙げられる。好ましくは前記金属の塩酸塩が挙げられ、より好ましくは二価金属の塩化物が挙げられる。

20 ここで二価金属の塩化物としては、具体的には塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化鉄、塩化マンガン等が例示され、好ましくは塩化カルシウムが挙げられる。すなわち本発明の最も好ましい金属塩溶液は塩化カルシウム溶液である。

以上を示した金属塩は、単独で、若しくは2種以上を組み合わせることにより、本発明の金属塩溶液の成分とすることができる。

25 本発明の核酸導入法において用いられる金属塩溶液(好ましくは塩化カルシウム溶液)は、高濃度の金属塩溶液である。ここで「高濃度」とは、0.1M以上の濃度であることを指す。具体的には0.1M~3.0Mの範囲が挙げられ、好ましくは0.3M~3.0Mの範囲が、より好ましくは0.5M~3.0Mの範囲が、さらに好ましくは0.5M~2.5Mの範囲が、特に好ましくは0.5M~2.0Mの範囲が、最も好ましくは1.0M~2.0Mの範囲が挙げられる。

前記金属塩を溶解する溶媒は、細胞培養に支障のない溶媒であれば如何なるもの

1 1

でもよいが、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等を用いることができる。

次に、本発明の核酸導入の方法について具体的に説明する。

- 5 まず、導入用の核酸と導入対象となる細胞とを培地中で接触させる。接触は、通常の細胞培養に適した培養容器中で行われる。ここで培養容器としては、細胞培養用ディッシュ、フラスコ、マルチプルウェルプレートなどが挙げられる。

10 核酸と細胞との接触方法としては、例えば、細胞懸濁培地に核酸を添加して細胞培養容器に播く方法、核酸を添加した培地で細胞を懸濁して細胞培養容器に播く方法、細胞を培養培地で懸濁して細胞培養容器に播き、その上に核酸を加える方法、核酸を予め細胞培養容器に添加しておき、その上に細胞を懸濁した培養培地を加える方法、核酸水溶液を予め細胞培養容器に添加して乾固又は吸着させ、その上に細胞を懸濁した培養培地を加える方法等がある。

15 ここで用いる核酸は、前述のように生体内分解性物質や生体由来物質との複合体あるいは封入体の形態であっても良い。特に、核酸水溶液を細胞培養容器に添加して乾固又は吸着させる方法において、当該複合体あるいは封入体が好適に用いられる。

20 具体的には、例えば核酸溶液とアテロコラーゲン水溶液との複合体溶液をマルチプルウェルプレートに添加して乾固させ、その上に細胞を懸濁した培養培地を加える方法が例示される。

接触させる核酸の量（濃度）および細胞数（密度）は、通常の遺伝子導入に用いられる程度であれば特に制限は無い。また接触の温度としては、0℃～42℃の範囲が、より好ましくは室温～37℃の範囲が挙げられる。

25 次に、前記核酸と細胞とを接触させた培地（以下、「工程（a）の培地」と称することもある）に対し、高濃度の金属塩溶液（好ましくは高濃度の塩化カルシウム溶液）を接触させる。接触方法としては、例えば、工程（a）の培地を含有する培養容器中に高濃度金属塩溶液を添加する方法や、高濃度金属塩溶液を予め細胞培養容器に添加しておき、そこに前記工程（a）の培地を添加する方法等が挙げられる。

高濃度金属塩溶液の接触（添加）の時期は特に制限されないが、細胞と核酸を接触後2時間以内、好ましくは30分以内、より好ましくは10分以内に高濃度金属塩溶液を接触させることが適当である。

高濃度金属塩溶液（好ましくは高濃度塩化カルシウム溶液）の接触（添加）量は、細胞への核酸導入が良好に行われる限り特に制限されないが、工程（a）の培地500 μ L当たり高濃度金属塩溶液1 μ L～20 μ Lを接触（添加）することが好ましい。また、工程（a）の培地500 μ L当たり高濃度金属塩溶液2 μ L～10 μ Lを接触（添加）することがより好ましく、工程（a）の培地500 μ L当たり高濃度金属塩溶液5 μ L～10 μ Lを接触（添加）することがさらに好ましい。

より具体的には、例えば24穴ウェルにおいては、1ウェルあたり500 μ L程度の工程（a）培地を含有するのが一般的であるため、1 μ L～20 μ L/ウェル、より好ましくは2 μ L～10 μ L/ウェル、さらに好ましくは5 μ L～10 μ L/ウェルの高濃度金属塩溶液を添加することが適切である。

高濃度金属塩溶液を添加した後、金属塩が均一に工程（a）培地に混合されるように培養容器を攪拌し、1時間～1日程度培養する。培養の条件は、細胞への核酸導入に支障をきたさない限り特に限定されないが、5%CO₂存在下、0℃～42℃の範囲で、好ましくは室温～37℃の範囲で、より好ましくは37℃にて行われる。

以上の操作により、核酸の導入が達成される。

前記本発明による核酸導入法は、細胞レベルでの遺伝子能解析の他、遺伝子組換え細胞株の作出や、ex vivoの遺伝子治療における細胞への核酸導入にも適用することができる。

本発明は、前記本発明の核酸導入法のために用いられる核酸導入剤を提供する。

本発明の核酸導入剤は、固形金属塩または高濃度の金属塩溶液を成分として含有することを特徴とする。具体的には、固形金属塩または高濃度の金属塩溶液からなる核酸導入剤が例示される。

ここで「金属塩」とは、細胞培養に影響しない範囲内であれば、如何なる金属塩溶液を用いても良い。細胞培養に影響するか否かは、細胞培養液に金属塩溶液を添加した場合としない場合とで細胞増殖速度（細胞密度）を比較することにより、容易に調べることができる。

13

具体的には、カルシウム、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、マンガン、鉄、銅、または亜鉛等の金属の塩が挙げられる。当該金属の塩として、より具体的には、例えば前記金属の塩酸塩、リン酸塩、硫酸塩、炭酸塩、または硝酸塩等が挙げられる。好ましくは前記金属の塩酸塩が挙げられ、より好ましくは二価金属の塩化物が挙げられる。

ここで二価金属の塩化物としては、具体的には塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化亜鉛、塩化鉄、塩化マンガン等が例示され、好ましくは塩化カルシウムが挙げられる。すなわち本発明の核酸導入剤の好ましい例として、本発明は、固形塩化カルシウムまたは高濃度塩化カルシウム溶液を成分として含有する核酸導入剤を提供する。より具体的には、固形塩化カルシウムまたは高濃度塩化カルシウム溶液からなる核酸導入剤が例示される。

以上に示した金属塩は、単独で、若しくは2種以上を組み合わせることにより、本発明の核酸導入剤の成分とすることができる。

本発明の核酸導入剤が高濃度の金属塩溶液を成分として含有する場合、その濃度は、0.1 M以上であれば如何なる濃度であっても良い。

前記したように、工程（a）の培地と接触させる金属塩溶液の濃度としては0.1 M～3.0 Mの範囲が挙げられ、好ましくは0.3 M～3.0 Mの範囲が、より好ましくは0.5 M～3.0 Mの範囲が、さらに好ましくは0.5 M～2.5 Mの範囲が、特に好ましくは0.5 M～2.0 Mの範囲が、最も好ましくは1.0 M～2.0 Mの範囲が挙げられる。従って本発明の核酸導入剤における金属塩の濃度は、希釈により若しくはそのまま使用することにより前記の濃度となるように調製されている必要がある。

従って本発明の核酸導入剤が高濃度の金属塩溶液（好ましくは高濃度の塩化カルシウム溶液）を成分として含有する場合、その濃度は、0.1 M以上であれば良く、好ましくは0.1 M～6.0 Mの範囲が挙げられ、より好ましくは0.1 M～4.0 Mの範囲が、さらに好ましくは0.5 M～4.0 Mの範囲が挙げられる。

前記金属塩を溶解する溶媒は、細胞培養に支障のない溶媒であれば如何なるものでもよいが、例えば蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等を挙げることがで

きる。

以上のような本発明の核酸導入剤は、核酸導入用のキットの一成分とすることができる。当該キットは、前記本発明の核酸導入剤のみからなるキットであっても、また本発明の核酸導入剤と他の成分とを含むキットであっても良い。当該キット中の他の成分としては、蛍光標識オリゴヌクレオチド、ポジティブコントロールsiRNAなどが挙げられる。また当該キットが固形金属塩を成分として含有する場合は、これを溶解する溶媒として、蒸留水、生理的食塩水、HEPES緩衝液（シグマ社）、TRIS緩衝液（シグマ社）、PBS緩衝液（Invitrogen社）、細胞培養培地等をさらに含有していても良い。

実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例 1

核酸導入法の検討（1）

24ウェル細胞培養プレートの各ウェルに100 μ g/mLのGFP発現プラスミド水溶液を100 μ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト副腎由来上皮細胞である293細胞（ATCC: Cell Biology Collection）を10%ウシ血清（FBS）含有DMEM培地（Sigma）に懸濁し、1ウェルあたり 2.5×10^4 個（500 μ L）播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0 μ L添加し、均一となるようにプレートを攪拌した。なお、培地中の最終塩化カルシウム濃度は1.8mM, 7.1mM, 10.2mM, 14.2mM, 19.5mM, 24.8mM, 30.1mMとなる。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

結果を図1に示す。図1より明らかなように、高濃度（1.7M）の塩化カルシウムを添加することにより、効率良く細胞に遺伝子導入できることが示された。また細胞の形態変化や細胞死は認められなかった。用いた24ウェルプレートでは、各ウェルに添加する1.7M塩化カルシウム溶液の量が2.5～8.0 μ Lで優れた遺伝子発現効率を得られた。

実施例 2

核酸導入法の検討 (2)

予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で細胞を懸濁しウェルに播種する以外は実施例 1 と同様にして、遺伝子導入効率の検討を行った。24ウェル細胞培養プレートに100 μ g/mLのGFP発現プラスミド水溶液を100 μ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。塩化カルシウム濃度がそれぞれ1.8mM, 7.1mM, 10.2mM, 14.2mM, 19.5mM, 24.8mM, 30.1mMとなるように培地に予め塩化カルシウム溶液を添加しておき、それぞれの培地を用いて293細胞を懸濁し、1ウェルあたり 2.5×10^4 個 (500 μ L) 播種した。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

結果を図 2 に示す。実施例 1 の結果 (図1) と異なり、予め塩化カルシウム溶液を添加した培地で細胞を懸濁しプレートに播種した場合は、遺伝子を導入することが出来なかった。これら実施例 1 および実施例 2 の結果から、細胞内への遺伝子導入促進効果は培地中の塩化カルシウム濃度の増加ではなく、塩化カルシウム溶液の加え方に起因することが示された。すなわち、細胞と遺伝子とをあらかじめ混合した後高濃度の塩化カルシウムと接触させることが重要であることが明らかとなった。

実施例 3

本発明の核酸導入法を用いた HeLa細胞への遺伝子導入

実施例 1 と異なる細胞においても本発明の遺伝子導入法が適用できるかどうか検討した。

24ウェル細胞培養プレートに100 μ g/mLのGFP発現プラスミド水溶液を100 μ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト子宮頸癌由来上皮細胞である HeLa細胞 (ATCC: Cell Biology Collection) を10%FBS含有DMEM培地 (Sigma) に懸濁し、1ウェルあたり 1.5×10^4 個 (500 μ L) 播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を0, 1.5, 2.5, 3.5, 5.0, 6.5, 8.0 μ L添加し均一となるようにプレートを攪拌した。細胞播種後4日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

結果を図 3 に示す。HeLa細胞においても1.7Mの塩化カルシウム溶液を細胞播種後

にウェルに添加することにより遺伝子を効率よく細胞に導入できた。また細胞の形態変化や細胞死も認められなかった。このことから、本発明の方法が細胞種に依らないことが示された。

実施例 4

5 本発明の核酸導入法を用いた siRNA の導入

発現プラスミド以外の核酸も本発明の遺伝子導入法により導入できるかどうか検討した。

ヒト FGF-4 の mRNA を特異的に抑制する siRNA (以下 hEx3-1 と称する) を導入用核酸として用いた。またヒト FGF-4 タンパクを強発現する細胞株であるヒト精巣腫瘍由来上皮細胞 NEC8 (ATCC: Cell Biology Collection) を導入用細胞として用いた。

6 ウェル細胞培養プレートに $10 \mu\text{g/mL}$ の hEx3-1 水溶液を $350 \mu\text{L}$ 添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。NEC8 細胞を 10% FBS 含有 DMEM 培地 (Sigma) に懸濁し、1 プレートあたり 3.75×10^5 個 (1.5mL) 播種した。細胞播種後直ちに 1.7M 塩化カルシウム水溶液を $20 \mu\text{L}$ 添加し、プレートを攪拌して均一とした。対照群として hEx3-1 を塗布乾燥していないウェルで同様の操作を行った。細胞播種後 3 日目に培地を回収して培地中の FGF-4 濃度を ELISA (Human FGF-4 Quantikine ELISA kit; R&D Systems) で定量した。またウェル中の細胞を回収してタンパク量を Bradford 法 (Bio-Rad Protein Assay; BioRad) で定量した。培地中の FGF-4 濃度を得られたタンパク量で徐して、各ウェル中での FGF-4 産生量を算出した。

20 結果を図 4 に示す。hEx3-1 の導入により培地中への FGF-4 の産生が抑制された。すなわち NEC8 細胞内に siRNA が効率よく導入され、siRNA が目的とする作用を良好に発揮することが示された。この結果から本発明の核酸導入法が核酸の種類に依らないことが示された。

実施例 5

25 本発明の核酸導入法を用いた遺伝子-生体由来物質複合体の導入

遺伝子の安定化効果および徐放効果を持つ生体由来物質と遺伝子との複合体が本発明の核酸導入法により導入できるか検討した。

生体由来物質としてはアテロコラーゲン ((株) 高研) を用いた。

$200 \mu\text{g/mL}$ の GFP 発現プラスミド水溶液と 0.016% のアテロコラーゲン水溶液を等量

17

で混合し、複合体溶液を調製した。24ウェル細胞培養プレートの各ウェルに複合体溶液を100 μ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト副腎由来上皮細胞である 293細胞およびヒト子宮頸癌由来上皮細胞である HeLa細胞 (ATCC: Cell Biology Collection) を10%ウシ血清 (FBS) 含有DMEM培地 (Sigma) に懸濁し、1ウェルあたり 2.5×10^4 個 (500 μ L) 播種した。細胞播種後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を5.0 μ L添加し、均一となるようにプレートを攪拌した。細胞播種後2日目に蛍光顕微鏡で細胞を観察してGFPを発現している細胞数を計測し、導入効率を算出した。

結果を図5に示す。図5から明らかなように、1.7Mの塩化カルシウム溶液を細胞播種後にウェルに添加することにより細胞にアテロコラーゲン複合体を導入できた。このことは複合体として核酸を導入することにより核酸の作用持続が図れることを示すものである。

実施例6

本発明の核酸導入法を用いた siRNA-生体由来物質複合体の導入

ヒトenhancer of zeste homolog 2 (EZH2)又は phosphoinositide 3'-hydroxykinase p110-alpha subunit (p110-alpha) に対するsmall interfering RNA (siRNA) の 300 nM水溶液と、0.016%アテロコラーゲン水溶液を等量で混合し、複合体溶液を調製した。6ウェル細胞培養プレートの各ウェルに複合体溶液を250 μ L添加し、冷風を吹きかける方法で乾燥した。ヒト前立腺がん由来細胞である、PC-3M-Luc-C6細胞 (Xenogen Corp.) を1ウェルあたり 5×10^4 個 播種した。細胞播種直後直ちに1.7M塩化カルシウム水溶液を20 μ L添加した。細胞播種後4日目にRNA抽出及びcDNA合成を行い、標的遺伝子のmRNAの発現量を、定量的PCR法にて解析した。なお結果は、内部標準として用いたGAPDHの発現量で補正した。

結果を図6に示す。図6から明らかなように、1.7Mの塩化カルシウム溶液を細胞播種後にウェルに添加することにより、細胞にsiRNAを導入することができた。

産業上の利用可能性

本発明により、新規な核酸導入法が提供される。本発明の核酸導入法は簡便かつ低細胞毒性で導入効率が高く、しかもローコストである。また細胞や核酸の種類を

問わず、幅広く用いることができる。

請求の範囲

1. 以下の工程 (a) 及び (b) を含む核酸導入法:

(a) 核酸と細胞とを培地中で接触させる工程、

5 (b) 前記 (a) の工程の後、高濃度の金属塩溶液を前記 (a) の培地と接触させる工程。

2. 核酸が一本鎖DNA、二本鎖DNA、一本鎖RNA、二本鎖RNA、オリゴヌクレオチドまたはリボザイムである、請求項1記載の核酸導入法。

10 3. 二本鎖DNAまたは二本鎖RNAが、直鎖状または環状の形態である、請求項2記載の核酸導入法。

4. 環状二本鎖DNAが発現プラスミドの形態である、請求項3記載の核酸導入法。

15 5. オリゴヌクレオチドが、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチド、2'-O-(2-メトキシ)エチルー修飾核酸(2'-MOE-修飾核酸)、短い干渉RNA(s i RNA)、架橋型核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)またはモルフォリノ・アンチセンス核酸である、請求項2記載の核酸導入法。

6. 核酸が生体内分解性の物質または生体由来物質との複合体若しくは封入体の形態である、請求項1〜5いずれか記載の核酸導入法。

20 7. 生体由来物質がアテロコラーゲンである、請求項6記載の核酸導入法。

8. 工程(a)の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M〜3.0Mの範囲内である、請求項1〜7いずれか記載の核酸導入法。

9. 工程(a)の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M〜2.0Mの範囲内である、請求項8記載の核酸導入法。

25 10. 工程(a)の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程(a)の培地500 μ L当たり1 μ L〜20 μ Lの範囲内である、請求項1〜9いずれか記載の核酸導入法。

11. 工程(a)の培地と接触させる高濃度金属塩溶液の量が、工程(a)の培地500 μ L当たり2 μ L〜10 μ Lの範囲内である、請求項10記載の核酸導入

20

法。

12. 金属塩溶液が二価金属の塩化物溶液である、請求項1～11いずれか記載の核酸導入法。

5 13. 二価金属の塩化物溶液が塩化カルシウム溶液である、請求項12記載の核酸導入法。

14. 固形金属塩または高濃度金属塩溶液を成分として含有する核酸導入剤。

15. 請求項1～13いずれか記載の核酸導入法のために用いられる、請求項14記載の核酸導入剤。

10 16. 高濃度金属塩溶液の濃度が0.1M～6.0Mの範囲内である、請求項14または15記載の核酸導入剤。

17. 高濃度金属塩溶液の濃度が0.5M～4.0Mの範囲内である、請求項16記載の核酸導入剤。

18. 金属塩が二価金属の塩化物である、請求項14～17いずれか記載の核酸導入剤。

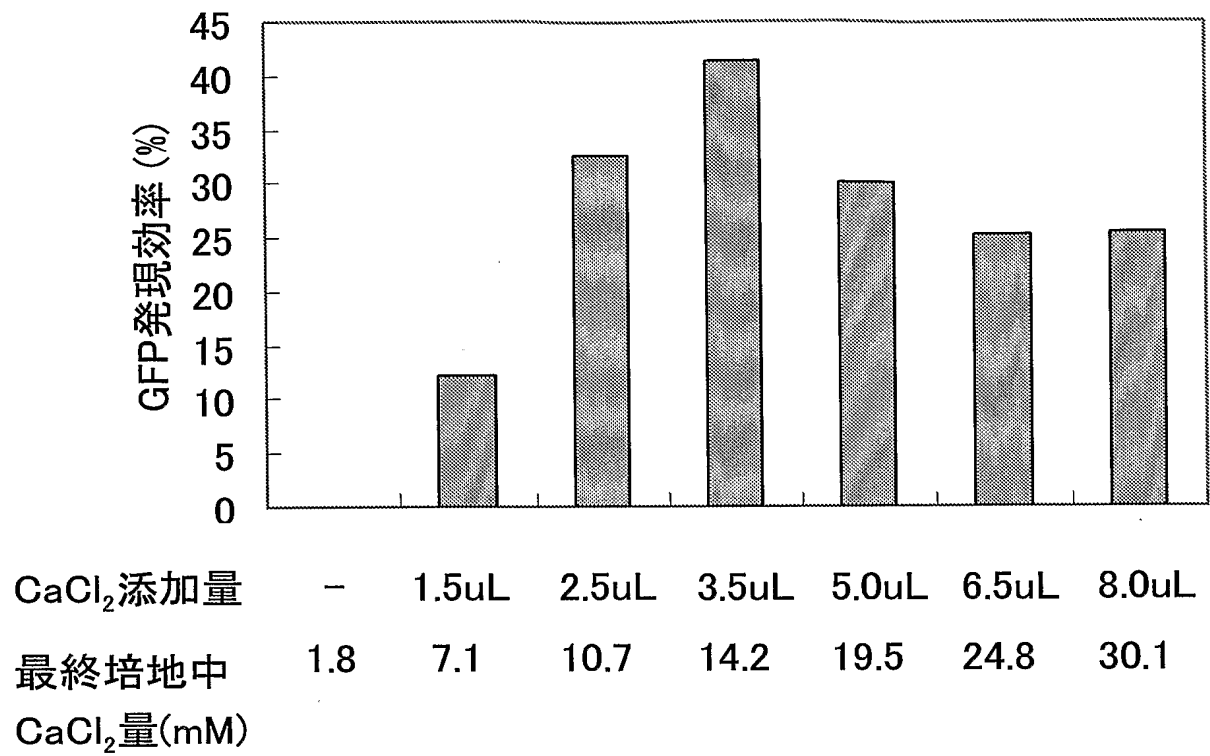
15 19. 二価金属の塩化物が塩化カルシウムである、請求項18記載の核酸導入剤。

20. 請求項14～19いずれか記載の核酸導入剤を含有する核酸導入用キット。

20 21. 請求項14～20いずれか記載の核酸導入剤またはキットの、核酸導入における使用。

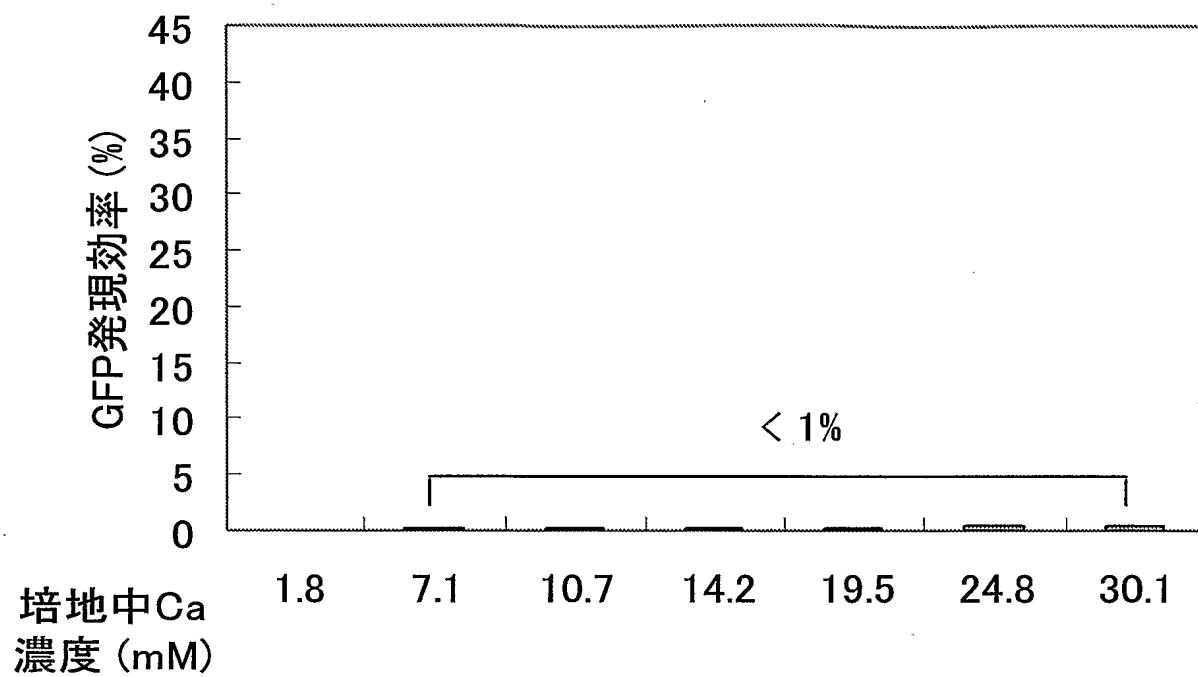
1/6

図 1



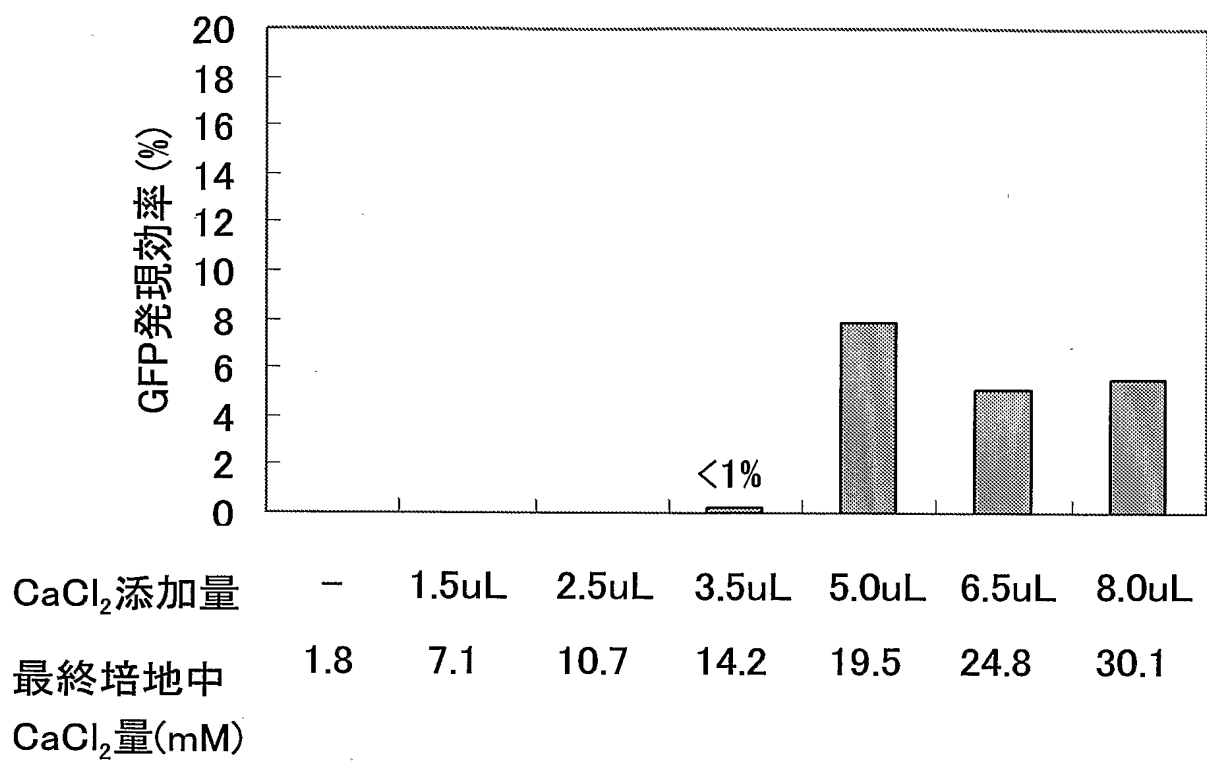
2/6

図 2



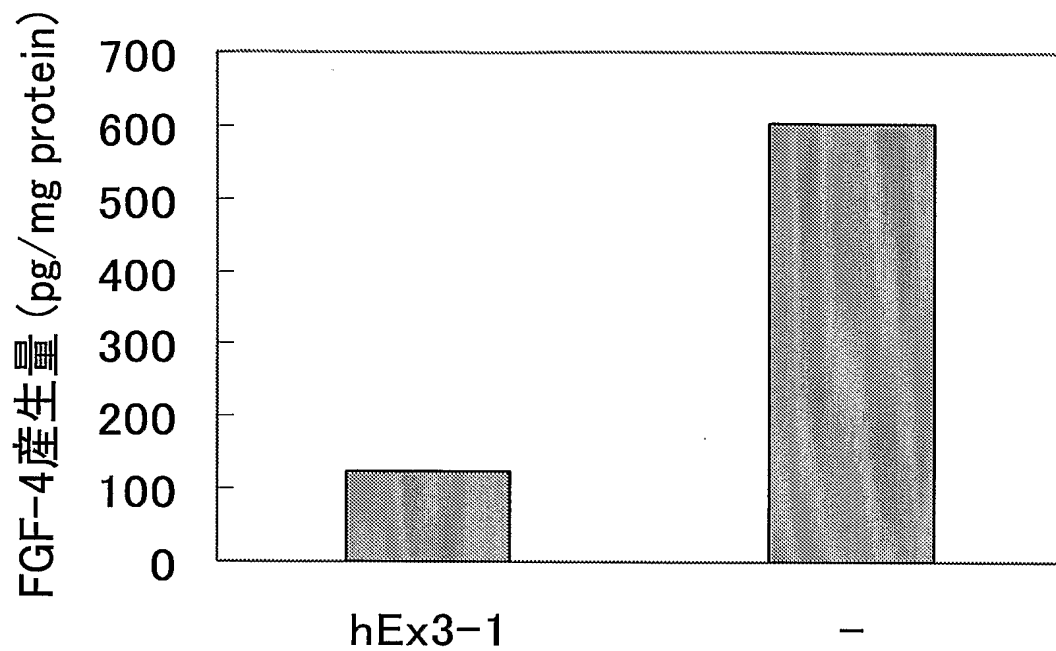
3/6

図 3



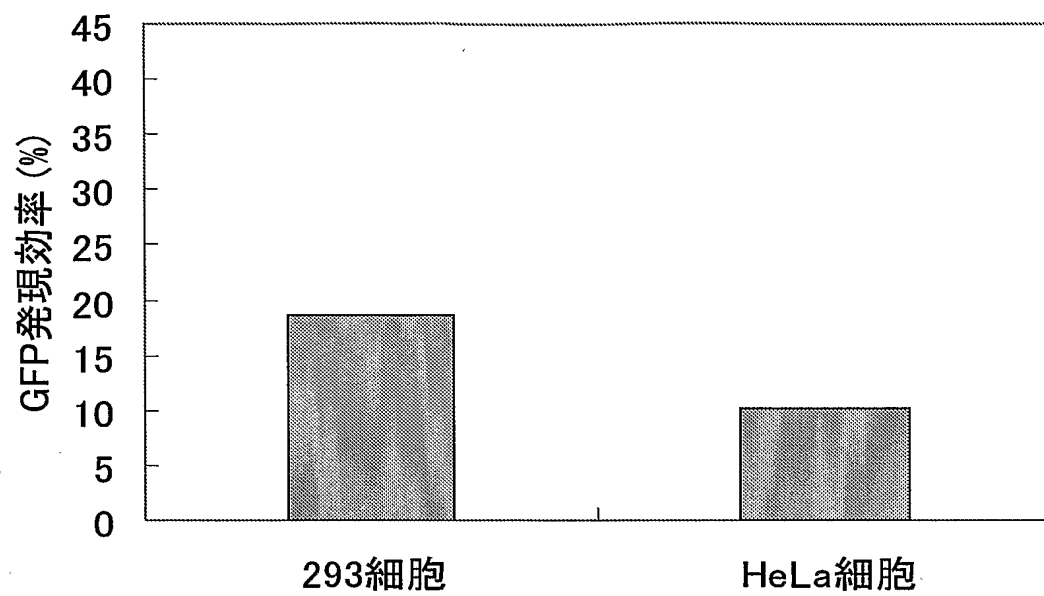
4/6

図 4



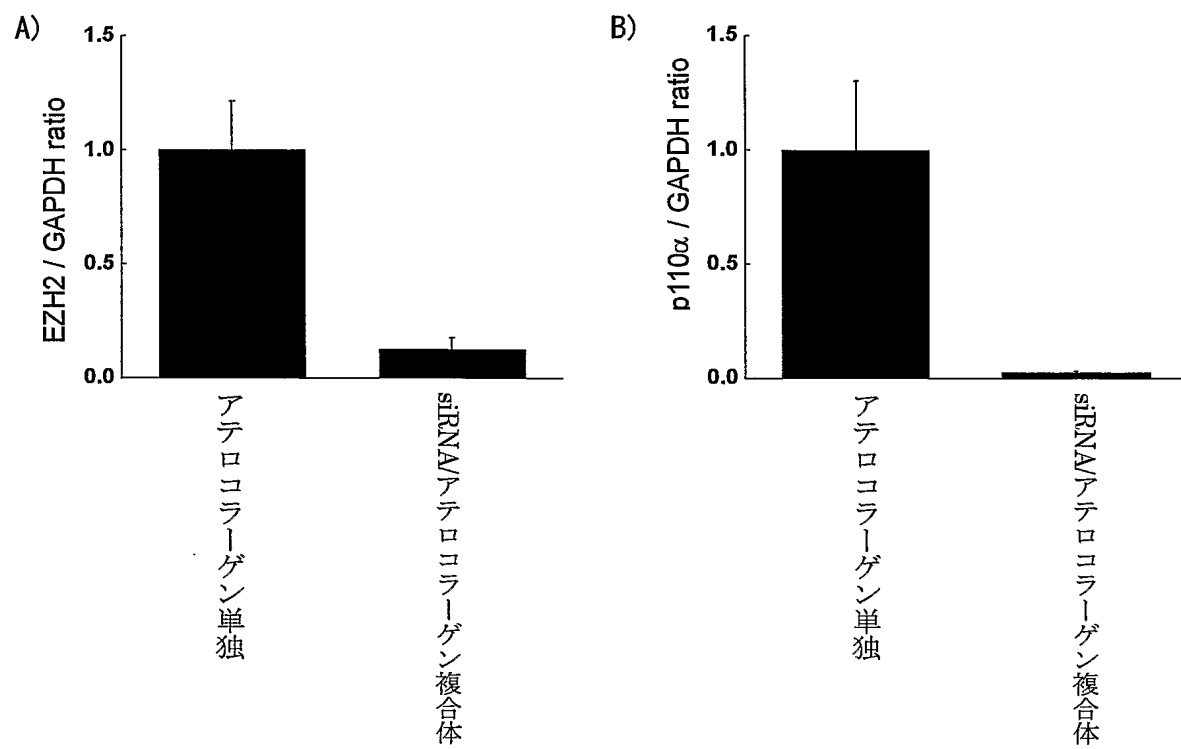
5/6

図 5



6/6

図 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/63

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/63

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 2002-325572 A (President of Osaka University), 12 November, 2002 (12.11.02), Full text & US 2002/0115219 A1 & EP 1225228 A2	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 2001-335512 A (Yamanouchi Pharmaceutical Co., Ltd.), 04 December, 2001 (04.12.01), Full text (Family: none)	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 01-157388 A (Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.), 20 June, 1989 (20.06.89), Full text (Family: none)	<u>14-21</u> 1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 April, 2005 (01.04.05)

Date of mailing of the international search report
26 April, 2005 (26.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019160

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	JP 04-091783 A (Toyobo Co., Ltd.), 25 March, 1992 (25.03.92), Full text (Family: none)	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 2003-274950 A (President of Osaka University), 30 September, 2003 (30.09.03), Full text & WO 2003/80848 A1	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	WO 00/73414 A1 (Bulut, Pinar), 07 December, 2000 (07.12.00), Full text (Family: none)	<u>14-21</u> 1-13
A	WO 01/97857 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 27 December, 2001 (27.12.01), Full text & EP 1295611 A1 & US 2004/0052840 A1	7-13
A	Honma K. et al., Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions, Biochem.Biophys. Res.Comm., 2001, Vol.289, No.5, pages 1075 to 1081	7-13
A	Takahiro OCHIYA, "Tennen Kobunshi ni yoru Idenshi Vector no Atarashii Unpan System", Experimental Medicine, 1999, Vol.17, No.17, pages 2288 to 2291	7-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019160

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of claims 1 to 13 and 14 to 21

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019160

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

The "special technical feature" of claim 1 relates to a method of transferring a nucleic acid by using a metal salt solution of a high concentration, while the "special technical feature" of parts of claims 14 to 21 relates to an agent for transferring a nucleic acid containing a solid metal salt as a component thereof.

Since it does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features, these groups of inventions are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/63

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/63

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS) BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 2002-325572 A (大阪大学長) 2002. 11. 12, 全文 & US 2002/0115219 A1 & EP 1225228 A2	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 2001-335512 A (山之内製薬株式会社) 2001. 12. 04, 全文 (ファミリーなし)	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 01-157388 A (三菱重工業株式会社) 1989. 06. 20, 全文 (ファミリーなし)	<u>14-21</u> 1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 04. 2005

国際調査報告の発送日

26. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

土井 芳子

4 N

3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) .. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> A	JP 04-091783 A (東洋紡績株式会社) 1992. 03. 25, 全文 (ファミリーなし)	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	JP 2003-274950 A (大阪大学長) 2003. 09. 30, 全文 & WO 2003/80848 A1	<u>14-21</u> 1-13
<u>X</u> A	WO 00/73414 A1 (Bulut, Pinar) 2000. 12. 07, 全文 (ファミリーなし)	<u>14-21</u> 1-13
A	WO 01/97857 A1 (住友製薬株式会社) 2001. 12. 27, 全文 & EP 1295611 A1 & US 2004/0052840 A1	7-13
A	Honma K. et al., Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, vol. 289, No. 5, pages 1075-81	7-13
A	落谷孝広, 天然高分子による遺伝子ベクターの新しい運搬システ ム, 実験医学, 1999, vol. 17, No. 17, pages 2288-91	7-13

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（特別ページ参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

1-13、14-21の一部

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(第1ページ第Ⅲ欄より続く)

請求の範囲1の「特別な技術的特徴」は、高濃度金属塩溶液を用いた核酸導入法に関するものであり、請求の範囲14-21の一部の「特別な技術的特徴」は、固形金属塩を成分として含有する核酸導入剤に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように関連しているものとは認められない。